CLART® CMA
KRAS·BRAF·PI3K

DETEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE MUTAÇÕES PONTUAIS EM 3 DOS GENES PERTENCENTES À VIA DO EGFR (RECETOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO) ASSOCIADOS AO CANCRO COLORRETAL – KRAS, BRAF E PI3K

PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K

CLART® CMA está sob a proteção de 2 famílias de patentes que correspondem aos pedidos de Patentes Interncionais PCT WO2013092839 e WO2014044828, e que incluem membros regionais e nacionais em diferentes territórios: Europa, Estados Unidos, Canadá, Brasil, México e China.

CLART®, CLART-Strip®, CAR® e SAICLART® são marcas registadas da GENOMICA.

Para mais informações, consultar o *website*: www.genomica.com

GENOMICA, S.A.U.
Parque Empresarial Alvento, Edificio B
Calle Vía de los Poblados, 1 – 1ª planta
28033 Madrid, Espanha
www.genomica.com

CE

Versão 7
Julho 2015

ÍNDICE:

1. **GLOSSÁRIO**

2. **DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO**

3. **COMPONENTES E CONSERVAÇÃO DA EMBALAGEM**

3.1 Reagentes de amplificação
3.2 Reagentes de visualização
3.3 Outros componentes

4. **MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS**

4.1 Reagentes e materiais
4.2 Equipamento

5. **RECOMENDAÇÕES E PROCEDIMENTOS DE MANIPULAÇÃO**

5.1 Recomendações gerais
5.2 Precauções para a visualização

6. **AMOSTRAS**

7. **PROTOCOLO DE TRABALHO**

7.1 Pré-tratamento da amostra
7.2 Material extraído
7.3 Reação de amplificação
7.4 Visualização do produto amplificado

8. **LEITURA DOS RESULTADOS**

9. **INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

10. **ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS E OPERACIONAIS**

11. **BIBLIOGRAFIA**

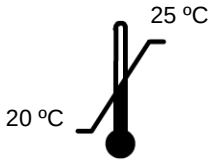
1. GLOSSÁRIO

Atenção! Consultar “Instruções de Utilização”

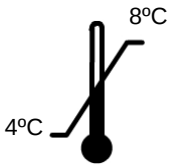
Prazo de validade

Dispositivo médico diagnóstico *in vitro*

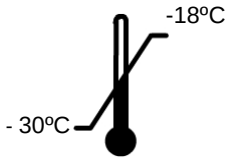
Lote



Conservar a temperatura ambiente



Conservar entre 4°C e 8°C



Conservar entre -30°C e -18°C

2. DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO

CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K deteta a presença das mutações pontuais mais frequentes na via do Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), que estão associadas ao cancro colorretal. As mutações pontuais detetadas pelo dispositivo são as seguintes:

KRAS: G12A
G12C
G12D
G12R
G12S
G12V
G13D
Q61H
Q61L

BRAF: V600E
V600K

PI3K: E542K
E545D
E545K
H1047R

AMOSTRA: biópsias colorretais embebidos em parafina-fixados em formalina.

A deteção é efetuada através da amplificação específica da mutação na amostra, dando origem a um fragmento variável para cada mutação de entre 100-200 pares de bases.

A amplificação é realizada num número variável de tubos de PCR, dependendo do gene a testar :

- A deteção de mutações pontuais para KRAS requer 3 tubos de amplificação de cores diferentes: branco, verde e vermelho.

- A deteção de mutações pontuais para BRAF requer 1 tubo de amplificação amarelo.

-A deteção de mutações pontuais para PI3K requer 2 tubos de amplificação azul e branco.

A deteção do produto amplificado pelo PCR é realizada através de uma plataforma de *microarray* de baixa densidade: CLART® (Clinical Arrays Technology). A plataforma baseia-se num princípio muito simples, mas ao mesmo tempo económico e eficaz, que consiste num *microarray* impressa no fundo de um poço de placa de microtitulação (CLART-Strip®-CS) (Figura 1) que simplifica todo o processo de hibridização e visualização, comparativamente aos sistemas clássicos de *microarray*s.

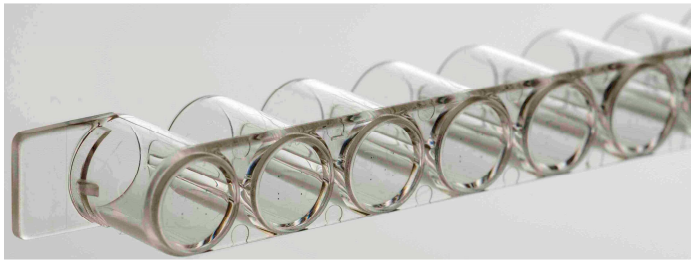


Figura 1. *Plataforma* ***CLART Strip®*** *(CS) em forma de tira de 8 poços.*

O sistema de deteção ***CLART®CMA KRAS·BRAF·PI3K*** baseia-se na precipitação de um produto insolúvel naquelas zona do *microarray* em que ocorre a hibridização dos produtos amplificados com sondas específicas. Durante o PCR, os produtos amplificados são marcados com biotina. Após a amplificação, estes produtos são hibridizados com as suas respetivas sondas complementares específicas que estão imobilizadas em zonas específicas e bem conhecidas do *microarray*. A seguir, são incubadas com um conjugado de estreptavidina-peroxidase. O conjugado liga-se através da estreptavidina à biotina presente nos produtos amplificados (que estão ligados às respetivas sondas), e a atividade da peroxidase provoca o aparecimento de um produto insolúvel na presença do substrato de o-dianisidina, que se precipita sobre as zonas do *microarray* em que ocorre a hibridização.

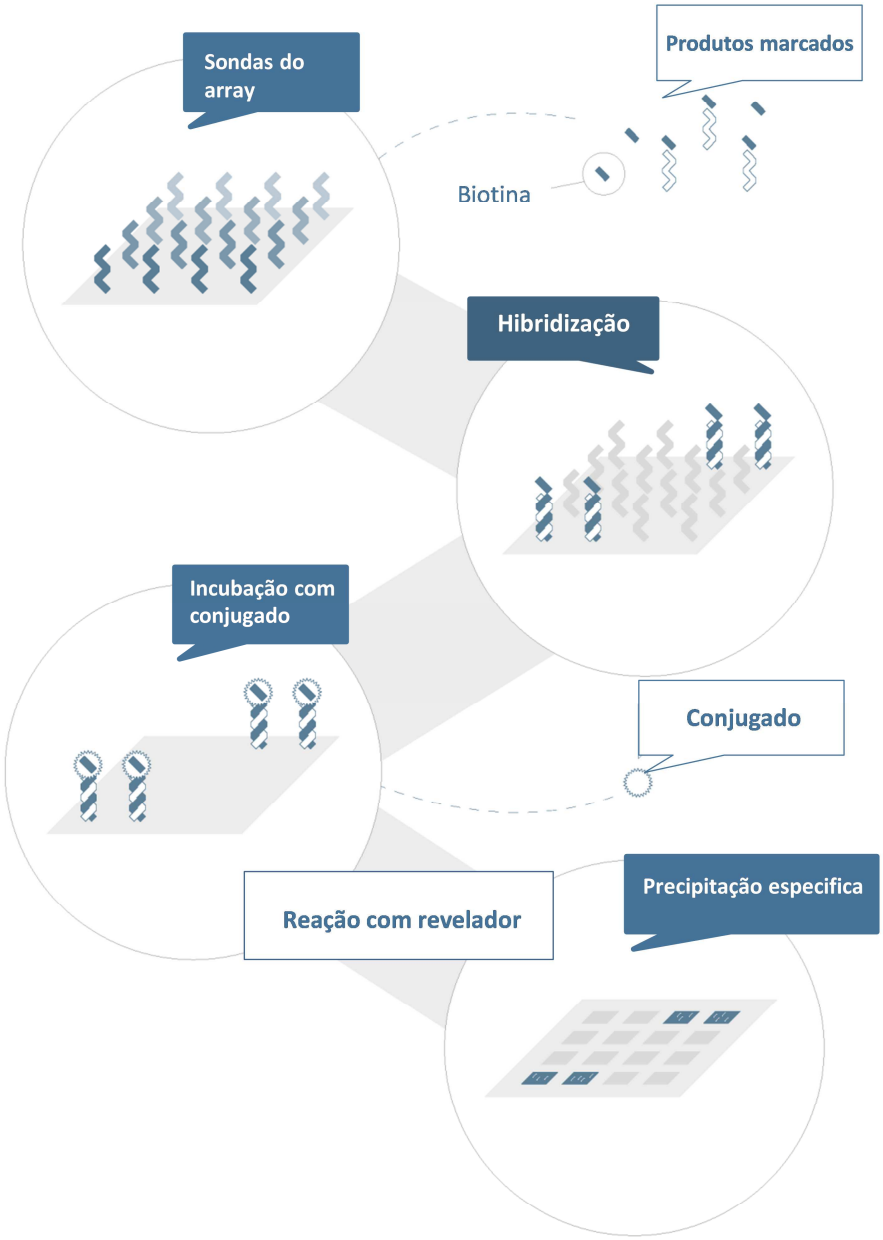


Figura 2: Diagrama do método de visualização. As sondas, imobilizadas sobre a superfície, captam os seus produtos amplificados complementares marcados com biotina. Com a ajuda de biotina, ligam-se ao conjugado, neste caso à estreptavidina-HRP (***H***orse***R***adish ***P***eroxidase = Peroxidase de rábano). Através da ação da HRP, o substrato de o-dianisidina produz um precipitado na zona onde ocorre a hibridização.

3. COMPONENTES E CONSERVAÇÃO DA EMBALAGEM

O dispositivo ***CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K*** contém reagentes suficientes para a análise de 8 ou 24 amostras clínicas. Os reagentes incluídos na embalagem foram agrupados em várias caixas, dependendo da temperatura a que devem ser conservados. Quando as recomendações de armazenamento são respeitadas, todos os reagentes têm condições para permanecer estáveis até ao prazo de validade da embalagem.

3.1 Reagentes de amplificação

São enviados e devem ser conservados a -20°C.

- **Tubos de amplificação** prontos a utilizar. Contêm 45 µl de mistura de reação. Só se deve descongelar sobre gelo o número exato de tubos de amplificação necessários e os restantes devem ser mantidos a -20°C.

  Para a análise do **GENE KRAS**, são fornecidos 3 tubos de amplificação:

  ***Mix* 1: Tubo branco; *Mix* 2: Tubo verde; *Mix* 3: Tubo vermelho.**
  Com estes três tubos, são determinadas as mutações G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, Q61H e Q61L.

  Para a análise do **GENE BRAF**, é fornecido 1 tubo de amplificação:

  ***Mix* 1: Tubo amarelo.**
  Com este tubo, são determinadas as mutações pontuais V600E e V600K.

  Para a análise do **GENE PI3K**, são fornecidos 2 tubos de amplificação:

  ***Mix* 1: Tubo branco; *Mix* 2: Tubo azul.**
  Com estes tubos, são determinadas as mutações E542K, E545D, E545K e H1047R.

Nota: **O dispositivo inclui uma tira adesiva indicadora de temperatura irreversível. O aparecimento de uma cor avermelhada na janela de visualização indica que, em algum momento, a temperatura de conservação de -20°C foi excedida e os produtos não devem ser utilizados.**

3.2 Reagentes de visualização

O dispositivo de visualização é enviado a 4°C. Este dispositivo deve ser conservado a 4°C, exceto as tiras e a solução de hibridização que devem ser conservadas a temperatura ambiente.

ADVERTÊNCIA! Após a receção, CLART-Strip® (CS), assim como a solução de hibridização (SH), devem ser conservadas a temperatura ambiente.

- **Tiras CS** (incluindo todas as sondas específicas). São fornecidas num envelope termosselado. **Conservar fechado, a temperatura ambiente, protegido da luz direta e de temperaturas elevadas.**
- **SH** (Solução de hibridização). **Conservar a temperatura ambiente.**
- **DC** (Solvente do conjugado). **Conservar a 4°C.**
- **CJ** (Conjugado). **Conservar a 4°C.** Centrifugar uma vez antes de utilizar.
- **RE** (Revelador). **Conservar a 4°C e protegido da luz.**
- **TL** (Tampão de lavagem). **Conservar a 4°C.**
- **Suporte e tampa para tiras de 8 poços (placa de microtitulação).**

3.3. Outros componentes

Para a captação e subsequente processamento da imagem, é necessário dispor de uma unidade de leitura, equipada com *software* específico, e um suporte para a placa:

- **Leitor CAR®** (CLINICAL ARRAY READER): permite a leitura e interpretação automática até 12 CS, isto é, até um total de 96 amostras. É distribuído por GENOMICA, para ser utilizado exclusivamente com os seus dispositivos de diagnóstico.
- **SAICLART®**: software desenvolvido e validado pela GENOMICA para processamento de imagens.
- **Software** específico do dispositivo ***CLART® CMA KRAS***·concebido e validado pela GENOMICA

Figura 3. CAR® (CLINICAL ARRAY READER)

4. MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

A seguir é apresentada uma lista de todos os materiais necessários, mas não fornecidos.

4.1 Reagentes e materiais

- Água destilada.
- Luvas descartáveis.
- Pontas de pipeta com filtro ou pipetas de deslocamento positivo.
- Recipiente com gelo picado.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml esterilizados.
- Suportes para tubos de 1,5 ml.
- Suporte para tubo de 0,5 ml/0,2 ml.
- Solução salina de cloreto de sódio NaCl a 0,9%

4.2 Equipamento

- Microcentrífuga
- Espetrofotómetro de UV visível.
- Termociclador convencional, rampas de arrefecimento/aquecimento até 3°C/segundo. (a velocidade máxima de rampa de arrefecimento/aquecimento é 3°C)
- Câmara de fluxo laminar para o laboratório de extração.
- Três micropipetas ajustáveis entre 1-20 µl, 20-200 µl e 200-1.000 µl para o laboratório de extração.
- Uma micropipeta ajustável entre 1-20 µl para adicionar o material genético aos tubos de amplificação.
- Três micropipetas ajustáveis entre 1-20 µl, 20-200 µl e 200-1.000 µl para o laboratório de visualização.
- Termobloco (termomisturador) compatível com placas de 96 poços e agitador ajustável a 20°C, 25°C e 50°C.
- Vórtex.
- Sistema de vácuo (desejável).

5. RECOMENDAÇÕES E PROCEDIMENTOS DE MANIPULAÇÃO

Ler atentamente esta secção antes de iniciar o ensaio, de modo a evitar contaminação!

5.1 Recomendações gerais

1. Este ensaio deve ser realizado em duas áreas fisicamente separadas, de modo a evitar a contaminação de amostras com o produto anteriormente amplificado. Devem ser disponibilizados materiais de trabalho para cada área (pipetas, pontas, tubos, suportes, luvas, etc.) que nunca devem ser utilizados fora das respetivas áreas.

1. Área Pré-PCR: Nesta área procede-se à extração de ADN e à preparação da amostra. A manipulação da amostra tem de ser efetuada numa câmara de biossegurança (BSC).

2. Área Pós-PCR: Nesta área procede-se à amplificação e visualização do produto amplificado. O material desta área nunca deve entrar em contacto com o material da área da extração. Não se deve reentrar na área de pré-PCR depois de ter trabalhado na área de visualização.

2. Use sempre luvas. Recomenda-se a troca frequente das luvas, embora seja obrigatório trocá-las antes de começar a trabalhar em cada uma das áreas acima mencionadas. Deve sempre utilizar-se luvas novas quando se adiciona ADN aos tubos de amplificação.

3. Limpe as áreas de trabalho (bancadas de laboratório, coberturas, suportes, pipetas) cuidadosamente com uma solução à base de lixívia diluída a 10% **após o processamento de cada lote de amostra.** É obrigatório desinfetar todas as áreas de trabalho em caso de contaminação. No caso dos termocicladores e termomisturadores, é aconselhável limpá-los antes de depois da utilização, seguindo as mesmas indicações.

4. Utilize sempre pontas de pipetas com filtro ou pipetas de deslocamento positivo para evitar possíveis contaminações por causa das micropipetas. Devem ser utilizados conjuntos de pipetas diferentes em cada área.

5. Utilize materiais de laboratórios esterilizados (em Autoclave) e descartáveis.

6. Nunca misture reagentes de dois frascos diferentes, mesmo que pertençam ao mesmo lote.

7. Feche imediatamente os tubos dos reagentes depois da utilização, para evitar a contaminação.

8. Elimine a ponta da micropipeta depois da sua utilização.

9. GENOMICA não se responsabiliza pelos resultados obtidos com o dispositivo, se forem utilizadas amostras diferentes das indicadas.

5.2 Precauções para a extração e adição de material extraído ao tubo de amplificação

1. Use sempre luvas
2. Limpe as superfícies de trabalho das câmaras com uma solução à base de lixívia diluída a 10%.
3. Ligue o fluxo laminar e a luz UV, pelo menos, 20 minutos antes da extração. Desligue a luz UV quando estiver a trabalhar no interior da câmara.
4. A preparação das amostras antes da extração deve ser feita dentro da câmara.

5.3. Precauções para a visualização

1. Antes de começar, recomenda-se que verifique o termomisturador, confirmando as temperaturas que serão utilizadas durante o ensaio: 20°C, 25°C e 50ºC. Para o efeito, utilize um termopar em contacto direto com a placa do termomisturador.

2. O produto amplificado só deve ser desnaturado uma única vez. Para a visualização, não utilize um produto de PCR que já tenha sido desnaturado mais do que uma vez. Se houver essa necessidade, deve fazer alíquotas antes do passo da desnaturação.

3. Evite que a ponta da pipeta ou o sistema de vácuo toque no fundo do poço, uma vez que isso pode danificar as sondas impressas no fundo.

4. Recomenda-se a adição de todas as soluções sobre a parede do poço CS e nunca diretamente sobre o fundo.

5. À temperatura ambiente, a solução SH (solução de hibridização) forma cristais, portanto, é necessário proceder a um preaquecimento a 50°C antes da utilização, até a solução ficar homogénea. Não adicione a solução SH enquanto os produtos desnaturados de PCR não estiverem prontos. Por conseguinte, a solução SH deve ser mantida a 50°C até ao momento da adição.

6. A matriz não deve ficar seca.

7. Após a incubação com a solução CJ, é muito importante lavar cuidadosamente o *microarray* para evitar que quaisquer resíduos reajam com a solução RE, produzindo uma precipitação não específica que pode originar falsas interpretações do resultado.

8. Evite a formação de bolhas quando adicionar qualquer reagente.

9. Quando visualizar a imagem no leitor, confirme o aparecimento de marcadores de posição e que não há bolhas, fibras ou manchas a interferir na leitura. Se for necessário, limpe a superfície exterior do poço com papel de celulose.

6. AMOSTRAS

O dispositivo *CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K* foi concebido e validado para ser utilizado com ADN extraído de biopsias de cancro colorretal. GENOMICA não se responsabiliza pelos resultados obtidos, se forem utilizados outros tipos de amostras.

7. PROTOCOLO DE TRABALHO

CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K foi validado utilizando dois protocolos distintos para o pré-tratamento da amostra.

7.1. Pré-tratamento da amostra:

Pré-processamento

As secções (tecido embebido em parafina e fixado com formaldeído) devem ser colocadas sobre uma lamela para serem examinadas pelo patologista.
Cada amostra deve ser processada utilizando um bisturi estéril novo.

O patologista procederá ao estudo de cada corte, tingindo-o com hematoxilina e eosina (H&E). Este processo ajudará a definir e a verificar a área cancerosa, que será indicada como uma percentagem (%) de células cancerosas.
A seguir, siga as instruções descritas:

- Com uma percentagem de células cancerosas <50% e uma área pequena: retirar 6 secções de 10 µm.
- Com uma percentagem de células cancerosas >50% e uma área maior: retirar 2-4 secções de 10 µm.
- No caso de grandes quantidades de tecido, independentemente da percentagem: retirar 1 secção de 10 µm.
- No caso de biopsias endoscópicas (muito pequenas): retirar 10 secções de 10 µm.

Colocar todas as secções recolhidas num tubo de 1,5 ml.

Entre estes dois protocolos, escolher o que melhor se adequar:

PROTOCOLO 1.

1. Adicionar 1 ml de xileno ao tubo que contém a amostra e agitar no vórtex durante 5 segundos.
2. Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Centrifugar o tubo a 13.200 rpm durante 5 minutos.
4. Eliminar o sobrenadante.
5. Adicionar 1 ml de etanol a 96-99% e agitar no vórtex durante 5 segundos.
6. Centrifugar o tubo a 13.200 rpm durante 2 minutos.
7. Eliminar o sobrenadante.
8. Incubar a 56°C aproximadamente 15 minutos para permitir a evaporação do restante sobrenadante (granulado seco).
9. Deste passo em diante, seguir o protocolo indicado no manual de utilizador do dispositivo QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen). O volume de eluição deve ser 50 µl.

PROTOCOLO 2.

Dia 1.

1. Centrifugar o tubo contendo a amostra durante 1 minuto, a 13.200 rpm, de modo a concentrar todas as secções da FFPE no fundo do tubo.
2. Aquecer o tubo (que contém a amostra) no termomisturador durante cinco minutos, a 75°C sem agitar.
3. Adicionar 190 µl de tampão de lise G2 (dispositivo EZ1 DNA Tissue, Qiagen) a cada amostra.

4. Incubar 5 minutos a 75°C, agitando a 1400 rpm.
5. Regular a temperatura do termomisturador para 56°C.
6. Adicionar 25 µl de proteinase K, preparada anteriormente de acordo com o manual do utilizador do dispositivo acima mencionado (20 mg/ml).
7. Incubar toda a noite a 56°C e agitar a 1.400 rpm.

Dia 2.

1. Adicionar 10 µl de proteinase K e agitar no vórtex por breves instantes.
2. Incubar toda a noite a 56°C e agitar a 1.400 rpm.

Dia 3.

1. Centrifugar 1 minuto a 13.200 rpm.
2. Adicionar 2 µl de glicogénio a 20 mg/ml (Opcional! É indicado para amostras com muito pouco material extraído anteriormente).
3. Recolher o sobrenadante.
4. Homogeneizar a amostra com a ponta da pipeta caso existam resíduos de tecido.
5. Passar o sobrenadante para um tubo, incluso na embalagem de extração (Qiagen) especificamente para a extração de amostras de FFPE.
6. Colocar o tubo específico no BIO-ROBOT EZ1, para continuar com a extração. O cartão tem de ser "ADN em parafina", e o volume de eluição tem de ser 50 µl.

7.2. Material extraído

O método de extração escolhido deve ser um que assegure os seguintes parâmetros de concentração e pureza:

1. A quantidade total de ADN extraído, adicionada a cada tubo de amplificação por PCR, deve ser de 150 ng. Excesso ou falta de ADN por dar origem a um diagnóstico incorreto.
   O intervalo de medição do ADN deve ser 15-30 ng/µl. Se os dados de medição ultrapassarem este intervalo, deve diluir a amostra até obter estes valores. No caso de obter valores inferiores a 15 ng/µl, a amostra deve ser extraída novamente.

   A tabela seguinte apresenta todas as possibilidades:

ADN extraído (ng/µl)	**Volume (µl) de ADN extraído adicionado a cada tubo de PCR**	**Quantidade total (ng) de ADN adicionada a cada tubo de PCR**
30	5 µl	150 ng
25 ng/µl	6 µl	150 ng
21, ng/µl	7 µl	150 ng
19 ng/µl	8 µl	150 ng
17 ng/µl	9 µl	150 ng
15 ng/µl	10 µl	150 ng

2. O ADN extraído deve ter a seguinte pureza suficiente para evitar um diagnóstico errado. A razão entre a absorvência a 250 nm e a absorvência a 280 nm deve ser tão próxima de 2 quanto possível.
   Se a pureza não for a adequada, a amostra deve ser extraída novamente.

3. O material extraído deve ser conservado a 4°C, quando for processado imediatamente após a extração. Se tal não acontecer, deve ser conservado a -20°C até à sua análise.

   É importante incluir um controlo negativo em cada conjunto para confirmar que as amostras não foram contaminadas durante os processos de extração, amplificação e visualização, o que pode dar origem a um resultado falso positivo.

7.3 Reação de amplificação

Recomendações específicas para a amplificação:

- Trabalhe na área pré-PCR, usando sempre uma câmara e seguindo as recomendações descritas na secção 5.1.
- Durante o processo, mantenha os tubos separados e refrigerados.
- Uso exclusivo de termocicladores convencionais, com velocidade de rampa de arrefecimento / aquecimento até 3°C por segundo. (A velocidade máxima de rampa de arrefecimento / aquecimento é de 3 °C). Não utilize termocicladores rápidos. Em alguns aparelhos, a velocidade de rampa pode ser ajustada consoante estas necessidades.

1. Descongele o número necessário de tubos de amplificação, de acordo com o número de amostras e gene(s) a analisar. Descongele os tubos a 4°C.

2. Centrifugue os tubos de amplificação durante alguns segundos, de modo a que todo o líquido se concentre no fundo dos tubos (caso não disponha de adaptadores de microcentrífuga para os tubos, pode utilizar tubos maiores depois de lhes ter cortado a tampa).

3. Adicione 5-10 µl (ver ponto 7.2) do ADN extraído a cada tubo de amplificação, depois de ter confirmado a concentração e pureza do ADN, e misture várias vezes com a micropipeta. Mantenha sempre os tubos refrigerados.

4. Programe os seguintes ciclos de temperatura no termociclador:

1 ciclo	95°C - 15 minutos
40 ciclos	94°C - 15 segundos 62°C - 60 segundos
1 ciclo	72°C - 10 minutos
Sempre a 4°C, até à recolha dos tubos (opcional)	

5. Inicie o programa e coloque os tubos no termociclador quando o bloco tiver ultrapassado os 90°C. Desta forma, são minimizadas possíveis amplificações não específicas devido a incubação abaixo da temperatura de hibridização. A duração dos intervalos de amplificação varia entre 90-150 minutos, dependendo do termociclador.
O produto amplificado deve ser visualizado **no prazo máximo de 5 dias** para evitar a sua degradação e mantido a 4°C.

7.4 Visualização do produto amplificado em CLART-Strip® (CS)

Recomendações específicas antes de iniciar a visualização:

O PROTOCOLO DESCRITO ABAIXO DEVE SER REALIZADO SEMPRE NA **ÁREA PÓS-PCR.** NUNCA LEVE O PRODUTO AMPLIFICADO PARA A ÁREA PRÉ-PCR.

1. Ligue o leitor CAR® (CLINICAL ARRAY READER) antes do início do procedimento. A autocalibração do equipamento demora alguns minutos e também é necessário introduzir o nome da amostra no programa antes da leitura. O aparelho deve estar pronto no momento da leitura para evitar esperas desnecessárias que originam uma exposição excessiva ao revelador.

2. Antes do início da hibridização, certifique-se de que o termomisturador esteve à temperatura de 50°C, pelo menos durante 60 minutos.

3. À temperatura ambiente, a solução SH (solução de hibridização) forma cristais, portanto, é necessário proceder a um preaquecimento a 50°C até a solução ficar homogénea, e esta deve ser mantida a essa temperatura (50°C) até à sua adição.

4. PREPARE A SOLUÇÃO DE LAVAGEM ANTES DE CADA ENSAIO. NÃO REUTILIZE SOLUÇÕES PREPARADAS ANTERIORMENTE OU RESÍDUOS.

5. Limpe o termociclador com uma solução à base de lixivia diluída a 10% antes de iniciar o programa de desnaturação. Coloque os tubos de amplificação no termociclador durante o processo que nunca deverá ultrapassar os 10 minutos.

6. Durante a visualização não é necessário utilizar pontas com filtro, mas é necessário usar uma ponta diferente para cada poço e mudá-la sempre que for adicionado um reagente, mesmo que seja um tampão TL. No entanto, é necessário usar pontas com filtro durante a adição dos produtos amplificados ao poço CS.

7. No caso de se utilizar bombas de vácuo, equipadas com pentes de 8 pontas para aspirar as soluções, os pentes devem ser eliminados após cada utilização ou desinfetados com uma solução à base de lixívia diluída a 10% após cada ensaio. Certifique-se de que a bomba aspira eficazmente e não deixa resíduos no fundo do poço.

8. Aspire as diferentes soluções até ao fim sem tocar na matriz.

VISUALIZAÇÃO:

1. Desnaturação:

Utilize o termociclador para desnaturar os produtos de PCR. Para este passo, coloque os tubos de amplificação no termociclador e incube a 95°C durante 8 minutos. Retire os tubos da incubação a 95°C e coloque-os de imediato num recipiente a 4°C. **Recomenda-se que não sejam excedidos os 10 minutos do tempo de desnaturação.**

2. Preparação da solução TL diluída:

Para cada tira CS (um total de 8 poços), prepare 10 ml de solução de lavagem diluída ao adicionar 1 ml de solução TL a 9 ml de água destilada.

3. Pré-lavagem da CS:

Antes de iniciar o ensaio, é necessário lavar as tiras, adicionando 200 µl de solução TL diluída a cada poço. Misture 10 a 15 vezes com a pipeta multicanal, tendo em atenção que não deve tocar na superfície da matriz. **É aconselhável que proceda a esta lavagem enquanto as amostras amplificadas estão a ser desnaturadas, e a solução de lavagem devem ser mantida no poço até à adição das amostras.** Elimine a solução TL diluída utilizando uma pipeta ou, de preferência, uma bomba de vácuo.
A matriz deve estar isenta de resíduos de solução, apesar de nunca dever ficar seca. Adicione imediatamente a solução seguinte.

4. Hibridização:

Antes de utilizar a solução SH, deve aquece-a a 50°C até à total dissolução dos sais. Assim que os produtos de PCR tiverem sido desnaturados, adicione 100 µl de solução SH (evitando a formação de bolhas) a cada poço CS. A seguir, adicione o produto de PCR de cada *mix* **ao mesmo poço da matriz, de acordo com os seguintes volumes:**

***Mix* 1 KRAS:** 5 µl
***Mix* 2 KRAS:** 5 µl
***Mix* 3 KRAS: 10** µl

***Mix* 1 BRAF:** 5 µl

***Mix* 1 PI3K:** 5 µl
***Mix* 2 PI3K:** 5 µl

Utilize uma matriz por amostra/doente. Misture várias vezes, tendo o cuidado de não tocar no fundo do poço. Recomenda-se que prepare cada tira de forma independente e separada do resto para evitar contaminações. Cubra a placa de microtitulação com a tampa de plástico fornecida e deixe incubar no termomisturador **durante 1 hora, a 50°C, agitando a 550 rpm** (previamente, este termomisturador deve ser aquecido até aos 50°C, pelo menos, durante 60 minutos, e deve certificar-se de que o termomisturador atingiu

corretamente os 50°C; ver ponto 5.3**). Para a correta interpretação dos resultados, é obrigatório visualizar todos os tubos da mesma amostra no mesmo poço, mesmo que sejam genes diferentes.**

Depois desta incubação, retire a placa do termomisturador e aspire a solução SH dos poços CS com uma pipeta ou, de preferência, com uma bomba de vácuo: A matriz deve estar isenta de resíduos de solução, apesar de nunca dever ficar seca. Adicione imediatamente a solução seguinte. Após a incubação, regule o termomisturador a 20°C e em movimento, para uma utilização posterior no passo 6.

5. Lavagem dupla:

   Adicione 200 µl de solução TL diluída a cada poço CS, volte a suspender 10 a 15 vezes com a pipeta multicanal. Elimine a solução TL diluída com uma pipeta ou, de preferência, com uma bomba de vácuo sem deixar quaisquer resíduos. **Repetir o procedimento. Este passo deve ser realizado com pontas diferentes para cada poço em ambas as lavagens.** Se ao chegar a este passo, o termomisturador não tiver atingido os 20°C, os poços devem ficar com a solução TL até o termomisturador atingir a temperatura.

6. Bloqueio e conjugado:

   Recomenda-se que centrifugue a solução CJ de alta afinidade durante 10 segundos antes de utilizar. Depois, prepare a solução CJ diluída da seguinte maneira: para cada tira CS, misture **1 ml de solução DC** e **15 µl de solução CJ de alta afinidade**. Prepare esta solução pelo menos 5 minutos antes de terminar o passo da hibridização.

   Elimine a solução TL diluída sem deixar quaisquer resíduos da solução e adicione 100 µl da solução CJ diluída a cada poço CS. Incube **durante 30 minutos certos** no termomisturador, **a 20°C e com 550 rpm.** Após esta incubação, retire a placa e elimine rapidamente a solução com uma pipeta ou uma bomba de vácuo multicanal. Depois de terminar a incubação, regule o termomisturador para 25°C e em movimento, para uma utilização posterior no passo 8.

7. Tripla Lavagem:

   Adicione de imediato 200 µl de solução TL diluída a cada poço CS, misture 10 a 15 vezes com a pipeta multicanal e elimine toda a solução com a pipeta ou a bomba de vácuo. **Repita este processo mais duas vezes.**

   É **muito importante** evitar que não fiquem quaisquer resíduos da solução CJ, visto que podem reagir com a solução RE e dar origem a um sinal não específico.

8. Revelação com a solução RE: Retire toda a solução TL diluída, adicione 100 µl de solução RE a cada poço CS e incube durante **10 minutos, a 25°C**, no termomisturador **sem agitar** (certifique-se previamente de que o termomisturador atingiu os 25°C**).**

   Advertência! É muito importante utilizar o termomisturador sem agitar.

9. Elimine toda a solução TL usando uma pipeta ou um sistema de vácuo. A matriz não pode ficar seca para a leitura.

10. Leitor CAR® (CLINICAL ARRAY READER): Realize os passos descritos no ponto 7.3. Coloque o suporte na bandeja do CAR® e a placa por cima. Assim que a bandeja é fechada, o processo de leitura é automático.

8. LEITURA DOS RESULTADOS

O processamento dos dados obtidos em cada análise é feito automaticamente. O sistema de leitura e análise (CAR®) fornecerá um relatório com os resultados.

9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cada gene tem o seu próprio controlo de extração para assegurar que há material genómico suficiente para realizar o teste.

Para a correta interpretação dos resultados, a amostra deve ser processada com todos os tubos de amplificação, correspondentes a cada gene a analisar, e visualizada na mesma matriz.

Como descrito no ponto 7.1, deve ser incluído um controlo negativo de extração para comprovar que as amostras não sofreram contaminações durante os processos de extração, amplificação e visualização, o que pode dar origem a um resultado falso positivo.

O controlo de extração do ADN genómico é necessário para a confirmação de um verdadeiro resultado negativo, uma vez que nos informa da presença do ADN do doente na amostra, mesmo que não tenha havido qualquer amplificação de qualquer mutação.

O controlo interno de amplificação permitir-nos-á distinguir entre casos de inibição da reação de PCR e aqueles em que não foi encontrado ADN na amostra.

Há três possibilidades que dão origem a um resultado de "**NÃO ANALISADO"**:

- Extração não válida: A presença de inibidores ou de um erro mecânico na extração da amostra não permite a amplificação das mutações e/ou dos controlos de amplificação e extração. Para resolver o problema, é necessário repetir todo o processo.

- Amplificação não válida: A ausência de amplificação num dos tubos e a presença de amplificação nos outros tubos indicam a realização de uma extração correta, mas que houve um erro na amplificação de um dos tubos. Para resolver o problema, é necessário realizar novamente à amplificação dos tubos correspondentes, antes de continuar o processo.

- Não inclusão do gene na análise: Quando qualquer um dos três genes não é incluído na análise, no relatório aparece "não analisado".

Há uma possibilidade de se obter um resultado **"INCONCLUSIVO"**:

- Nos casos em que as leituras de absorvência das réplicas das sondas de uma matriz sejam muito diferentes umas das outras.

10. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS E OPERACIONAIS

10.1 Controlo de interferências conhecidas:

Os falsos negativos são um dos obstáculos na deteção por amplificação genómica devido a uma qualidade inadequada do ADN extraído (devido a uma quantidade de amostra insuficiente, à degradação do ADN, à conservação inadequada ou à perda de ADN durante a extração) ou à presença dos inibidores da polimerase do ADN nas amostras a processar (álcool, sais, etc.).

Com o dispositivo ***CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K***, estes falsos negativos foram eliminados ao adicionar os diferentes controlos internos que são indicativos da eficiência da reação de amplificação dos diferentes tubos.

No entanto, para evitar estas interferências, as indicações descritas nas secções 5, 6 e 7 deste manual têm de ser seguidas.

10.2. Especificações técnicas:

Parâmetros analíticos:

Sensibilidade analítica. A sensibilidade analítica foi determinada pela amplificação de uma série de diluições de plasmídeos recombinantes para cada uma das mutações detetadas pelo dispositivo. Cada um deles contém o produto amplificado (incluindo a parte complementar das sondas específicas de deteção). Esta sensibilidade também foi determinada através da amplificação de uma série de diluições de linhas celulares comerciais que contêm a mutação a determinar. A visualização foi feita no CS, dando origem aos seguintes resultados (Tabela 1):

Mutação pontual	Nº de cópias do plasmídeo recombinante por reação PCR	Quantidade de ADN das linhas celulares
G12A	1000	1 ng
G12C		
G12D		
G12R		
G12S		
G12V		

G13D		
Q61H		
V600E		
V600K		
E542K		
E545D		
E545K		
H1047R		

Tabela 1. Relação do número de cópias do plasmídeo recombinante/nanogramas da linha celular necessários para obter uma sensibilidade de 100% na deteção de cada um dos microrganismos.

Especificidade analítica. Foram realizados testes de especificidade com 13 plasmídeos recombinantes e linhas celulares, observando-se que não ocorreu uma deteção não específica de outras mutações diferentes das que se pretende determinar. Por conseguinte, considera-se que a técnica atinge uma especificidade analítica de 100%.

Parâmetros de utilidade diagnóstica:

De modo a determinar os parâmetros diagnósticos do dispositivo, foi efetuada uma avaliação comparativa do dispositivo ***CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K*** com a técnica de referência (TheraScreen®). Para esta avaliação, houve uma colaboração com os seguintes laboratórios:

- Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Vall d'Hebron, Barcelona, Espanha
- Departamento de Patologia, Centro de Investigação Clínica do Hospital Universitário de Copenhaga, Hvidovre, Dinamarca.
- Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Universitário 12 de Octubre, Madrid, Espanha.

A presença de cada uma das mutações detetadas com o dispositivo foi analisada em 408 extratos de biopsias.

Para cada amostra, o resultado foi considerado verdadeiro, se houve concordância entre a técnica de referência e ***CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K***. Em caso de discordância entre as duas técnicas, foi considerado como válido o resultado obtido na sequenciação.

Mutação	n=408	Sensibilidade	Especificidade	PPV	NPV
G12A	25	96,00	99,48	92,31	99,74
G12C	23	86,96	100,00	100,00	99,23
G12D	68	98,53	99,71	98,53	99,71
G12V	52	92,31	100,00	100,00	98,89
G12R	7	100,00	99,75	87,50	100,00
G12S	25	96,00	100,00	100,00	99,74
G13D	39	92,31	100,00	100,00	99,19
Q61H	3	100,00	100,00	100,00	100,00
Q61L	2	100,00	100,00	100,00	100,00
V600E	30	100,00	99,47	93,75	100,00
V600K	2	100,00	100,00	100,00	100,00
Tipo selvagem	132	NA	98,51	NA	97,06

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade diagnósticas da técnica *CLART® CMA- KRAS-BRAF.PI3K* para cada mutação. PPV: valor previsto positivo. NPV: valor previsto negativo.

NOTA: devido à sua baixa prevalência, não tem havido amostras positivas em relação as seguintes mutações: E542K, E545D, E545K e H1047R. Portanto, não foi capaz de estabelecer os parâmetros de diagnóstico para esses mutações

Especificidade diagnóstica:
A técnica foi validada com um número de 132 amostras negativas, dando origem a uma especificidade próxima dos 100% para todas as mutações pontuais.

Reprodutibilidade e repetibilidade diagnóstica.
Os dados obtidos são os seguintes: Reprodutibilidade: 94,4% (n=67 amostras) e repetibilidade: 94,4% (n=51 amostras).

As séries de reprodutibilidade e repetibilidade foram processadas, começando pela extração da biopsia até à visualização na matriz do material amplificado.

11. BIBLIOGRAFIA

Molecular Mechanisms of resistance to Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer. A Bardelli & S Siena. 2010, J Clin Oncol, 28: 1254-61.

Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. S Siena, A Sartore-Bianchi, F Di Nicolantonio, J Balfour, A Bardelli. 2009, J Natl Cancer Inst, 101: 1308-24.

Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PI3KCA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. W De Roock, B Claes, D Bernasconi, J De Schutter, B Biesmans, G Fountzilas et al. 2010, Lancet Oncol, 11: 753-62.

KRAS, BRAF, PI3KCA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. W De Roock, V De Vriendt, N Normanno, F Ciardiello, S Tejpar. 2011, Lancet Oncol, 12: 594-603.